

**ISOLASI DAN PEMEKATAN ENZIM SELULASE *Trichoderma* sp.
LBKURCC28 MENGGUNAKAN METODE PENGGARAMAN
(NH₄)₂SO₄ 80% SERTA PENENTUAN AKTIVITAS DAN AKTIVITAS
SPESIFIK ENZIM**

Febry Kurniawan, Titania T. Nugroho, Andi Dahliaty

**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
*febry.ryku@gmail.com***

ABSTRACT

Cellulase enzyme activity can be increased by concentrating the enzyme using saturated ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) 80%. Precipitated enzyme was redissolved by the addition of acetate buffer solution pH 5.5 to 1/70 times its original volume. Cellulase enzyme activity was determined using substrates CMC and avicel. The test results showed that the activity of concentrated CMCase increased 75 times and avicelase enzyme activity increased 9 times. Activity and specific activity concentrated CMCase was 0,4060±0,0845 U/ml and 0,7306±0,1526 U/mg respectively, while activity and specific activity of concentrated avicelase were 0,0129±0,0182 U/ml and 0,0232±0,0328 U/mg respectively.

Keywords: ammonium sulfate, cellulase, *Trichoderma* sp.

ABSTRAK

Enzim selulase dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan pemekatan menggunakan metode penggaraman ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) 80% jenuh. Enzim yang terendapkan dilarutkan kembali dengan penambahan larutan buffer asetat pH 5,5 hingga 1/70 kali volume semula. Aktivitas enzim selulase ditentukan menggunakan substrat CMC dan avisel. Hasil pengujian menunjukkan aktivitas enzim CMCase pekat semimurni meningkat sebesar 75 kali dan aktivitas enzim aviselase meningkat sebesar 9 kali. Enzim CMCase pekat semimurni memiliki aktivitas dan aktivitas spesifik sebesar 0,4060±0,0845 U/ml dan 0,7306±0,1526 U/mg. Enzim aviselase pekat semi murni memiliki aktivitas dan aktivitas spesifik sebesar 0,0129±0,0182 U/ml dan 0,0232±0,0328 U/mg.

Kata kunci: amonium sulfat, selulase, *Trichoderma* sp.

PENDAHULUAN

Enzim selulase adalah enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke medium pertumbuhannya. Enzim selulase diproduksi untuk mengkatalisis pemecahan selulosa menjadi glukosa dengan pemutusan ikatan -1,4-glukosidik yang terdapat pada selulosa. Enzim ini sangat penting dalam proses biokonversi atau perubahan secara biologi limbah-limbah organik mengandung selulosa menjadi glukosa. Glukosa yang dihasilkan dapat dijadikan bahan baku pembuatan bioetanol (Acharya dkk., 2008).

Salah satu jamur yang mampu menghasilkan enzim selulase ekstraseluler adalah *Trichoderma* sp. *Trichoderma* sp. merupakan jamur yang distribusinya paling luas di antara jamur tanah lain, terdapat pada berbagai substansi yang ada di dekat tanah pertanian, hutan, padang rumput dan lingkungan lain seperti kayu tebang atau yang telah lapuk, bahkan di peralatan dapur (Rejeki, 2007).

Penambahan garam dalam suatu protein akan menyebabkan terjadinya peningkatan daya kelarutan yang disebut *salting in*. Peningkatan daya kelarutan disebabkan adanya stabilitas protein akibat koefisien aktivitas dari gugus-gugus ionogeniknya. Selama kekuatan ioniknya terus meningkat atau bertambah sampai titik maksimumnya, maka mulai terjadi penurunan daya larutnya, hal ini disebut *salting out*. Saat terjadi *salting out*, terjadi kompetisi di antara protein dan garam dalam menarik molekul air untuk proses pelarutan, maka interaksi protein dengan protein menjadi lebih penting (Bintang, 2010).

Amonium sulfat memiliki daya larut yang sangat tinggi, dan garam ini

paling banyak digunakan untuk fraksinasi protein-protein. Amonium sulfat yang jenuh disiapkan pada suhu ruang dengan menambahkan 767 g pada 1 liter akuades, dan ini disebut larutan saturasi 100%, dan dengan fraksinasi dinyatakan secara relatif terhadap saturasi tersebut (Bintang, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim selulase melalui pemekatan menggunakan ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄).

METODE PENELITIAN

a. Peremajaan isolat jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 pada media PDA

Isolat jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 diambil dengan menggunakan ose secara aseptis dan diinokulasikan ke media PDA. Media PDA yang telah diinokulasikan isolat jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 diinkubasi pada suhu ruang selama 6 hari atau hingga spora hijau tumbuh subur.

b. Inokulasi jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 pada media cair

Spora jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 yang diremajakan pada media PDA dibilas dengan larutan salin steril (NaCl 0,8%) dan dilepaskan dari media dengan menggunakan ose secara aseptis. Larutan disaring menggunakan *glasswool* sehingga diperoleh suspensi spora. Sebagian suspensi spora diukur ODnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm ($OD_{660nm} = 0,34 \sim 7 \times 10^{12}$). Suspensi spora diinokulasikan pada media cair produksi selulase dan diinkubasi pada suhu ruang dengan pengocokan menggunakan *rotary shaker* pada

kecepatan putaran 150 rpm selama 96 jam.

c. Produksi enzim selulase

Produksi selulase dilakukan dengan menginokulasi 7×10^{12} spora dari isolat pada 25 mL media produksi. Kultur cair ini kemudian diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan pengocokan 150 rpm selama 96 jam. Selulase yang telah diproduksi dalam media produksi dipisahkan dari miselia jamur menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin pada suhu $5-10^{\circ}\text{C}$ dan kecepatan putaran 9500 rpm selama 10 menit. Filtrat disaring menggunakan kertas Whatman GF/C sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim dan disterilisasi menggunakan Nalgene™ *Sterile Disposable Bottle Top Filters* dengan membran *Poly Ether Sulfonat* (PES) $0,45 \mu\text{m}$. Ekstrak kasar enzim ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02% dan disimpan dalam pendingin. Konsentrasi gula pereduksi ekstrak kasar enzim dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

d. Pemekatan enzim selulase

Enzim diendapkan dari ekstrak kasar dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ secara perlahan dalam keadaan dingin ($5-10^{\circ}\text{C}$) sambil diaduk hingga mencapai tingkat kejenuhan 80%. Larutan dibiarkan selama 30 menit sambil diaduk. Endapan dipisahkan dari filtrat menggunakan sentrifugasi dingin selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Endapan

ditambahkan dengan larutan buffer asetat 0,05 M pH 5,5 hingga terjadi pemekatan yang diperkirakan mencapai $70\times$ volume. Jadi misalnya volume awal adalah 70 mL, penambahan buffer pada endapan adalah 1 mL. Enzim pekat yang diperoleh ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,02%. Konsentrasi gula pereduksi enzim selulase dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dan kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry.

e. Penentuan gula pereduksi dengan metode Nelson-Somogyi

Analisis aktivitas enzim dilakukan menggunakan dua macam substrat *Carboxymethylcellulose* (CMC) dan avisel. Aktivitas enzim diuji sebelum dan setelah proses pemekatan. Sebanyak 500 μL substrat CMC/avisel 2% dan diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu 40°C dan aduk perlahan, selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit dalam *waterbath* suhu 40°C . Tambahkan 500 μL reagen Nelson-Somogyi. Tabung dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit. Tambahkan 500 μL reagen arsenomolibdat, didiamkan selama 5 menit. Tambahkan 3 mL akuades, didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada $\lambda=540 \text{ nm}$.

f. Penentuan kadar protein dengan menggunakan metode Lowry

Larutan sampel protein sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 9,8 mL Na_2CO_3 2%, 0,1 mL NaK-Tartarat 2,7%, dan 0,1 mL CuSO_4 1%. Larutan dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu tambahkan reagen folin-ciocalteau sebanyak 1 mL dan

dihomogenkan. Tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi diukur pada $\lambda = 700$ nm. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap larutan protein standar yakni *Bovine Serum Albumine* (BSA) dengan berbagai konsentrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemekatan enzim selulase bertujuan untuk meningkatkan aktivitas enzim dengan cara mengurangi kandungan senyawa-senyawa lain dari ekstrak kasar enzim. Pemekatan enzim menggunakan metode penggaraman amonium sulfat 80%. Metode ini merupakan salah satu cara yang sederhana dan murah dan juga tidak merusak enzim. Amonium sulfat yang

dilarutkan dalam air akan menyebabkan terjadinya proses *salting out* sehingga protein akan mengendap. Salting out terjadi sebagai akibat dari kompetisi antara ion-ion dari garam amonium dan molekul enzim dalam berinteraksi dengan molekul air. Dengan tingginya kadar ion, menyebabkan molekul protein lebih memilih untuk berinteraksi dengan molekul protein lainnya sehingga membentuk endapan, meskipun mengendap namun tidak sampai menyebabkan struktur protein dari enzim rusak dan kehilangan aktivitasnya. Hasil uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase *Trichoderma* sp. LBKURCC28 menggunakan substrat CMC ditunjukkan pada Tabel 1 dan substrat avisel pada Tabel 2.

Tabel 1: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (CMCase) *Trichoderma* sp. LBKURCC28.

Jamur <i>Trichoderma</i> sp. LBKURCC28	Rata-rata aktivitas enzim (10^{-3} U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat kemurnian CMCase (Endoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	5,35 \pm 1,10	1 \times	0,0093	0,5759 \pm 0,1141	1
Supernatan	0,60 \pm 0,40	0,11 \times	TD	TD	TD
Enzim selulase pekat	406 \pm 84,5	75 \times	0,5557	0,7306 \pm 0,1526	1,26

Keterangan: TD = tidak terdeteksi

Tabel 2: Uji aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase (aviselase) *Trichoderma* sp. LBKURCC28.

Jamur <i>Trichoderma</i> sp. LBKURCC28	Rata-rata aktivitas enzim (10^{-3} U/mL)	Kelipatan pemekatan	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg protein)	Tingkat kemurnian aviselase (Endoglukanase)
Ekstrak kasar enzim	1,35 \pm 1,91	1 \times	0,0093	0,2054 \pm 0,1453	1
Supernatan	0,33 \pm 0,24	0,244 \times	TD	TD	TD
Enzim selulase pekat	12,9 \pm 18,2	9 \times	0,5557	0,0232 \pm 0,0328	0,1

Keterangan: TD = tidak terdeteksi

Media substrat penghasil enzim selulase yang digunakan adalah campuran dari CMC dan avisel. Substrat CMC digunakan sebagai substrat penghasil CMCase dan avisel untuk menghasilkan enzim aviselase oleh jamur *Trichoderma* sp. LBKURRCC28. Substrat CMC memiliki struktur yang amorf, dan enzim yang mampu menghidrolisis substrat CMC adalah enzim endoglukanase. Substrat avisel memiliki struktur kristalin dan enzim yang mampu menghidrolisis substrat avisel adalah enzim eksoglukanase (Lynd dkk., 2002).

Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh jamur *Trichoderma* sp. LBKURCC28 diukur dengan cara menghitung jumlah gula pereduksi menggunakan metode Nelson-Somogyi. Aktivitas yang dihitung adalah aktivitas dari enzim CMCase (endoglukanase) dan aviselase (eksoglukanase). Jumlah protein yang dimiliki oleh enzim dihitung dengan metode Lowry. Jumlah protein dihitung untuk mengetahui aktivitas spesifik suatu enzim. Aktivitas spesifik enzim diketahui dengan cara menghitung perbandingan antara aktivitas terhadap jumlah protein. Semakin besar nilai aktivitas spesifik suatu enzim maka enzim tersebut memiliki aktivitas yang baik. Aktivitas spesifik enzim yang tinggi bermanfaat dalam industri karena mampu melakukan reaksi dengan sedikit enzim. Penentuan aktivitas enzim CMCase dan aviselase bertujuan untuk mengetahui spesifisitas enzim yang digunakan.

Tabel 1 menunjukkan aktivitas enzim CMCase. Ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas CMCase sebesar $0,00535 \pm 0,0011$ U/mL dan enzim pekat sebesar $0,406 \pm 0,0845$ U/mL. Hasil ini menunjukkan terjadi peningkatan aktivitas sebesar 75 kali

dari aktivitas semula dengan proses pemekatan 70 kali volume awal. Aktivitas enzim menjadi tinggi dikarenakan molekul-molekul enzim telah dipisahkan dari berbagai macam molekul lain yang terdapat pada ekstrak kasar enzim. Supernatan dari proses pemekatan memiliki aktivitas enzim CMCase sebesar $0,0006 \pm 0,0004$ U/mL. Adanya aktivitas CMCase pada supernatan dikarenakan ada juga enzim yang terdapat pada supernatan dan tidak ikut mengendap. Jika dibandingkan dengan dengan ekstrak kasar enzim aktivitas pada supernatan sangat kecil.

Ekstrak kasar enzim memiliki rata-rata aktivitas aviselase sebesar $0,00135 \pm 0,00191$ U/ml. supernatan yang didapat dari proses pemekatan memiliki $0,00033 \pm 0,00024$ U/ml. Enzim pekat dari proses pengendapan menggunakan metode penggaraman amonium sulfat 80% memiliki rata-rata aktivitas aviselase sebesar $0,0129 \pm 0,0182$ U/ml. Aktivitas enzim pekat semi murni ini meningkat sebesar 9 \times . Aktivitas spesifik dari ekstrak kasar enzim aviselase dan enzim pekat semi murni adalah sebesar $0,2054 \pm 0,1453$ U/mg dan $0,0232 \pm 0,0328$ U/mg. Penurunan aktivitas enzim aviselase setelah proses pengendapan dikarenakan sebagian enzim ada yang tidak mengendap, serta juga terjadi kehilangan aktivitas enzim akibat adanya garam yang terikat pada enzim.

KESIMPULAN

Pemekatan enzim menggunakan ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) 80% jenuh meningkatkan aktivitas enzim CMCase sebesar 75 kali dari aktivitas semula. Aktivitas ekstrak kasar enzim CMCase sebesar $0,00535 \pm 0,0011$ U/mL dan aktivitas enzim pekat sebesar

0,406±0,0845 U/mL. Perhitungan aktivitas spesifik enzim, menunjukkan adanya peningkatan sebesar 1,26 kali, aktivitas spesifik enzim dari 0,5759±0,1141 U/mg menjadi 0,7306±0,1526 U/mg. Aktivitas ekstrak kasar enzim aviselase sebesar 0,00135±0,00191 U/ml dan enzim pekat memiliki aktivitas sebesar 0,0129±0,0182 U/ml. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa terjadi peningkatan sebesar 9 kali. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim aviselase sebesar 0,1358±0,192 U/mg dan aktivitas spesifik enzim pekat semimurni sebesar 0,0129±0,018 U/mg.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Prof. Dr. Titania T. Nugroho dan ibu Dra. Andi Dahliaty M.S yang telah memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan hasil penelitian. Penelitian ini didanai oleh skim penelitian Fundamental a.n. Prof. Dr. Titania T. Nugroho sebagai ketua tim peneliti dengan Dana Desentralisasi DP2M Dirjen Dikti, Kemendikbud, Lembaga Penelitian Universitas Riau, nomor kontrak 321 NN.19.2/PL/2013, DIPA-023.04.2.415.92/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, P. B., Acharya, and Modi, H. A. 2008. Optimization for Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Saw Dust as Substrate. *African Journal of Biotechnology*. **22**: 4147-4152.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Erlangga, Jakarta.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van zyl, W. H., Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**(3): 506-577.
- Rejeki, S.S.S. 2007. Penentuan pH dan Potensial Air Optimum Terhadap Pertumbuhan Miselium *Trichoderma viride* TNJ63 dalam Media Produksi Enzim Selulase dan Kitinase. *Skripsi*. FMIPA-UR, Pekanbaru.